

1. Fluoreszierende Proteine

1.1. Das grün fluoreszierende Protein aus *Aequorea victoria*

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist seit seiner Entdeckung eines der wichtigsten Instrumente der Molekularbiologie. Dabei erfolgte die Entdeckung zufällig durch eine Gruppe von Wissenschaftlern, die die Oxoluciferase Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria* (Abbildung 1) isolierten. Sie fanden heraus, dass Aequorin mit einem nach UV-Anregung grün fluoreszierenden Protein assoziiert vorliegt, dessen Emissionsspektrum identisch mit dem des *Aequorea*-Gewebes ist (Shimomura *et al.*, 1962).

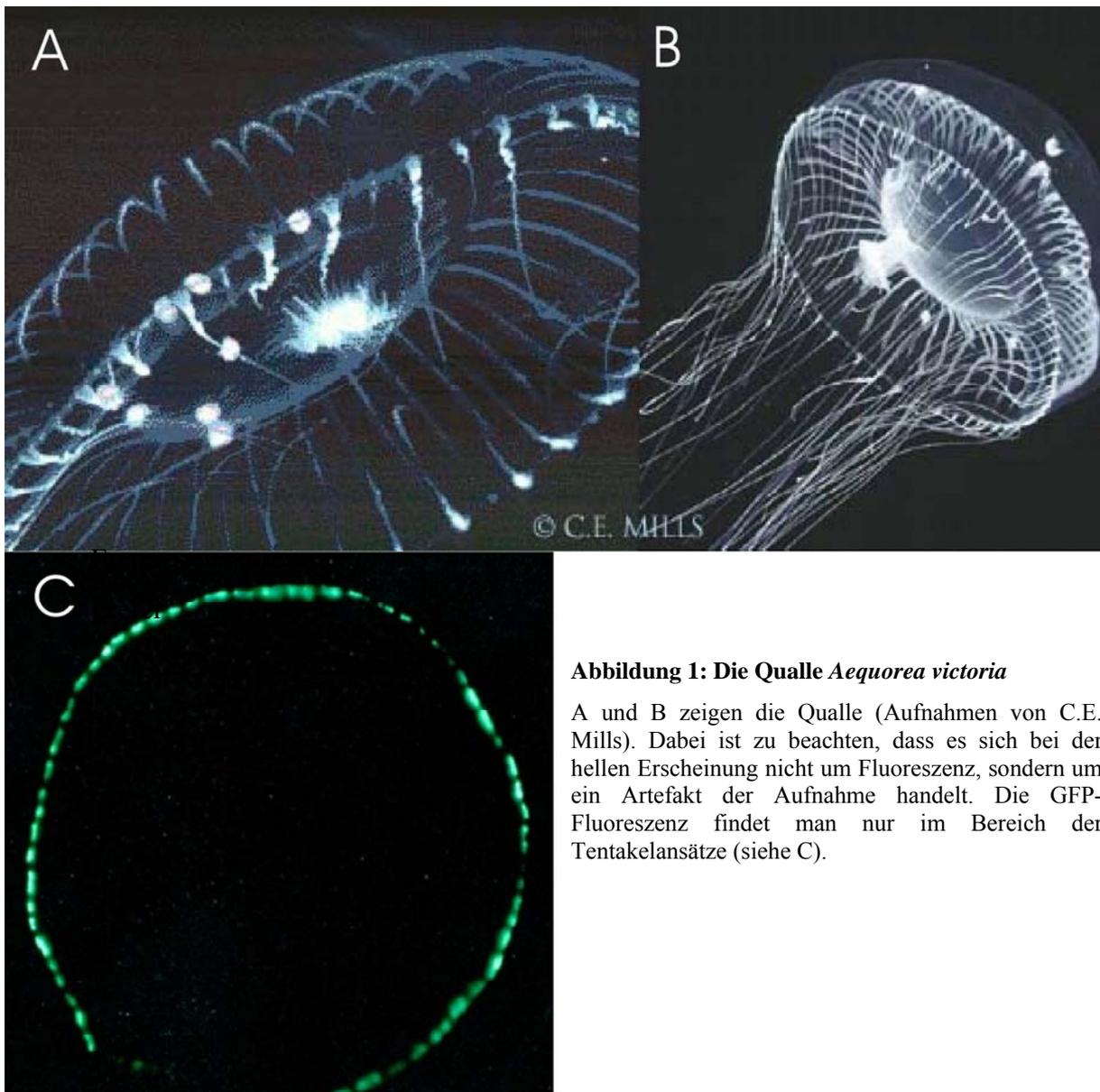
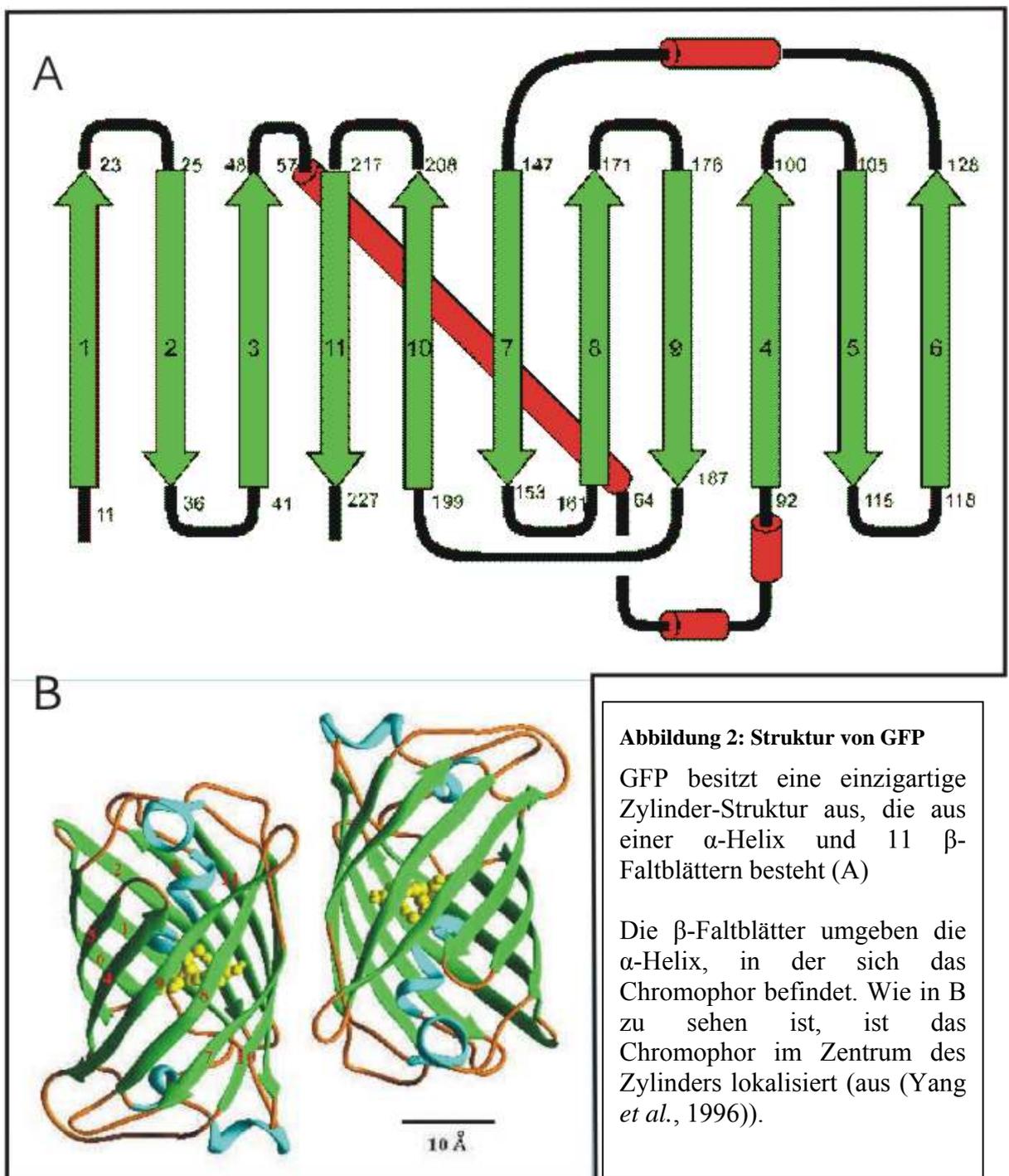


Abbildung 1: Die Qualle *Aequorea victoria*

A und B zeigen die Qualle (Aufnahmen von C.E. Mills). Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der hellen Erscheinung nicht um Fluoreszenz, sondern um ein Artefakt der Aufnahme handelt. Die GFP-Fluoreszenz findet man nur im Bereich der Tentakelansätze (siehe C).

Der Vergleich der Emissions- und Anregungsmaxima von GFP und Aequorin zeigte, dass sich das Emissionsmaximum von Aequorin mit einem Anregungsmaximum von GFP deckt, was auf eine Anregung des GFPs durch Aequorin hindeutet. Tatsächlich konnte dieser strahlungsfreie Energietransfer 1974 zum ersten Mal gezeigt werden (Morise *et al.*, 1974). Die Primärsequenz von GFP wurde 1992 zum ersten Mal veröffentlicht (Prasher *et al.*, 1992). Sie besteht aus 238 Aminosäuren, die eine ungewöhnliche Struktur ausbilden. Diese wurde 1996 durch zwei Gruppen unabhängig voneinander bestimmt (Ormo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996).



Eine weitere Besonderheit von GFP ist, dass es keinerlei Co-Faktoren für die Fluoreszenz benötigt. Die Chromophor-Gruppe, ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on, wird von den Aminosäuren 65-67 (SYG im wildtypischen Protein) in einem autokatalytischen Prozess gebildet (Abbildung 3).

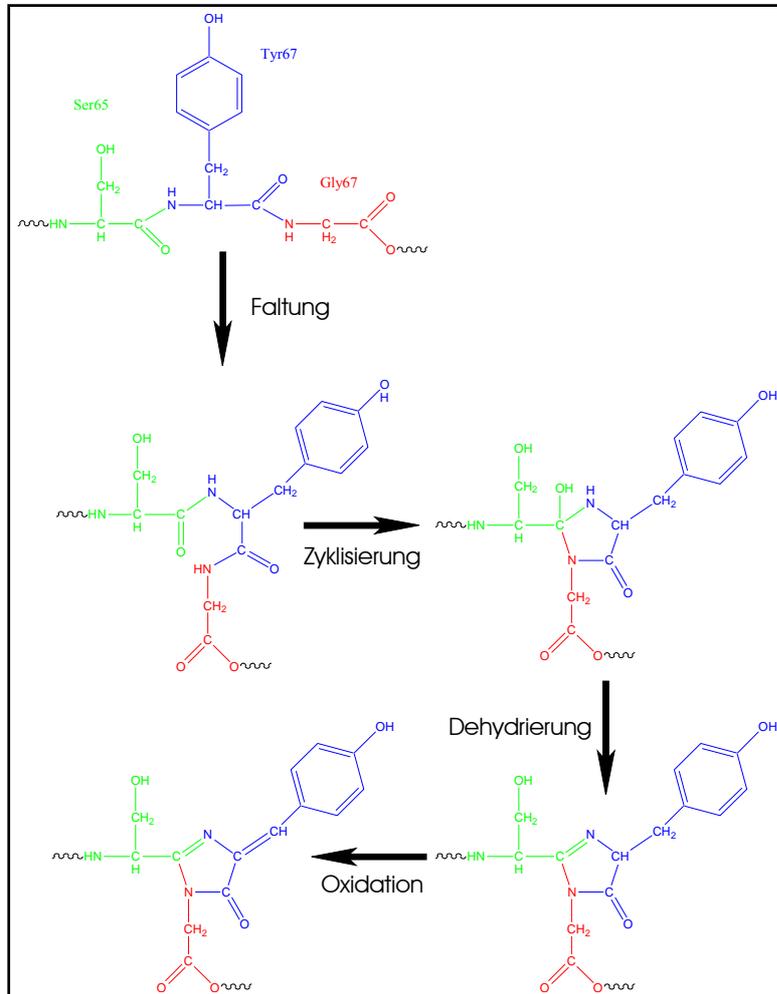


Abbildung 3: Autokatalytische Synthese des Chromophors von GFP

Durch Faltung des Proteins werden die direkt beteiligten Aminosäuren Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ und Gly⁶⁷ in räumliche Nähe gebracht. Durch den nukleophilen Angriff der Amid-Gruppe des Gly⁶⁷ und anschließender Dehydrierung wird das Imidazolinon gebildet. Durch Oxidation der α - β -Bindung des Tyr⁶⁶ wird der aromatische Rest in Konjugation mit dem Imidazolinon-Ring gebracht und dadurch die chromophore Gruppe fertiggestellt (Cubitt *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1994; Reid und Flynn, 1997).

Interessant ist, dass GFP zwei Absorptionsmaxima, jedoch nur ein Emissionsmaximum besitzt. Im Protein kann das Tyr⁶⁶ in seiner Hydroxy-Form (mit einem Anregungsmaximum bei 395nm) oder der deprotonierten Enolat-Form (Anregungsmaximum bei 470nm) vorliegen (siehe Abbildung 4 und 5). Der einzige fluoreszierende Zustand ist jedoch die angeregte Phenolat-Form, die Licht bei 509nm emittiert. Durch die Anregung wird der Säure-Charakter des Tyr⁶⁶ erhöht und es erfolgt der Übergang in die Phenolat-Form unter Abspaltung eines Protons. Unter Lichtemission kehrt diese in den Grundzustand zurück (Ormo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Youvan und Michel-Beyerle, 1996).

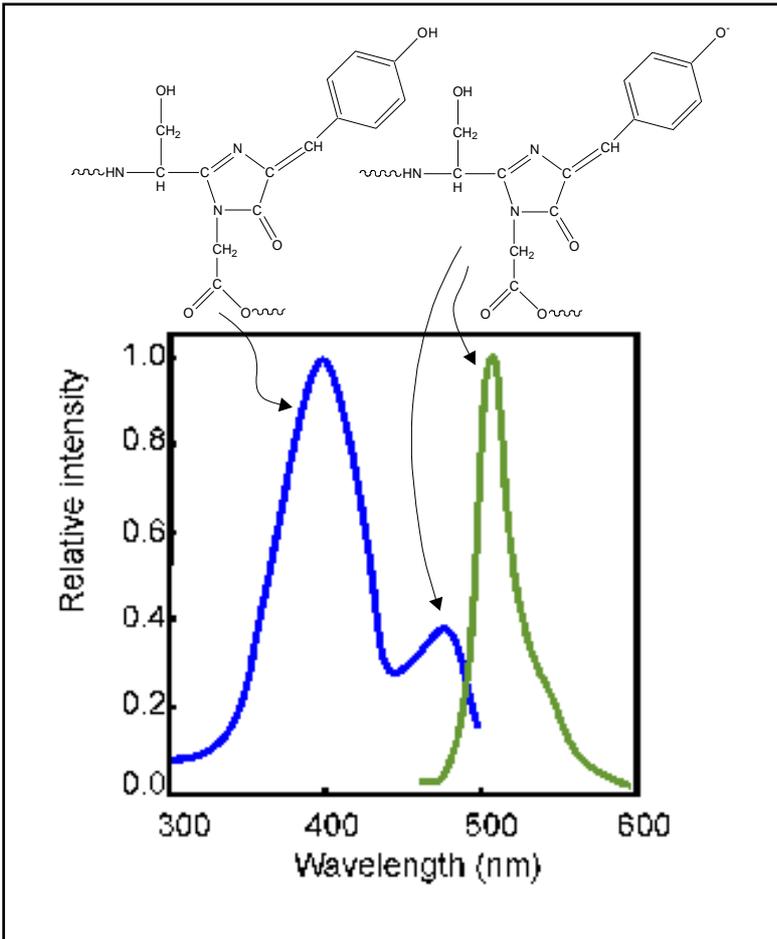
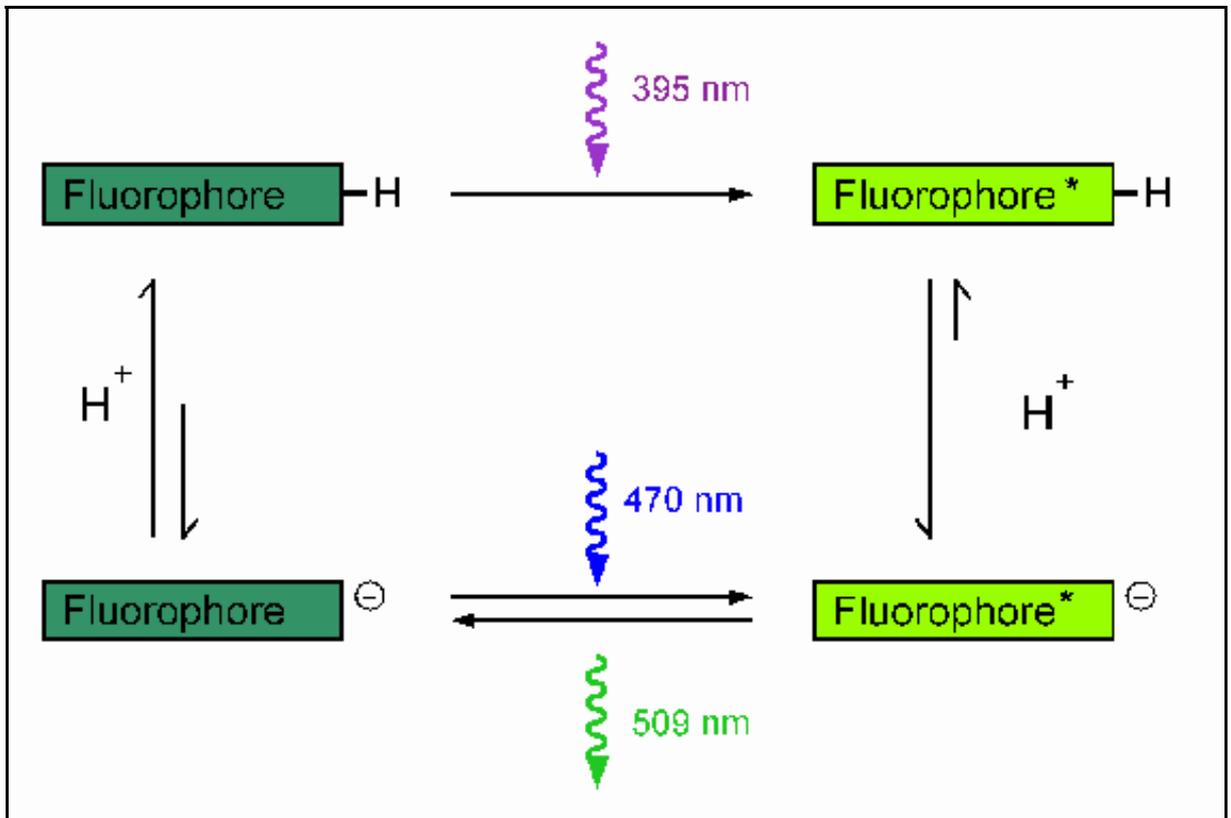


Abbildung 4: Absorptions- und Emissionsspektrum von GFP

Das Absorptionsspektrum ist in blau, das Emissionsspektrum in grün angegeben (nach (Chalfie *et al.*, 1994); modifiziert). Die für die Peaks verantwortlichen Strukturen sind oben angegeben, die angeregte Phenolat-Form des Tyr⁶⁶ (rechte Seite) ist die einzige, die Licht emittiert und damit für den Emissions-Peak bei 509nm verantwortlich. Sie absorbiert bei 470nm. Die Hydroxyl-Form absorbiert bei 395nm, emittiert jedoch kein Licht, sondern lagert sich in den angeregten Phenolat-Zustand um (s.u.).

Abbildung 5: Schema der Anregung des GFPs



GFP ist, vermutlich aufgrund der kompakten Struktur, ein außerordentlich stabiles Protein. Es ist über einen sehr großen pH-Bereich (pH 5-12) stabil und denaturiert erst bei Temperaturen über 65°C. Außerdem ist es nahezu resistent gegenüber den meisten Proteasen, u.a. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Papain und zeigt auch eine sehr hohe Stabilität in Detergenz-haltigen Lösungen wie z.B. 1% SDS, Triton X-100, Tween 80, CHAPS oder Lösungen chaotroper Substanzen wie z.B. 8 M Harnstoff, 4 M Guanidin/HCl. In Fusionsexperimenten stellte sich heraus, dass GFP sowohl C- als auch N-terminal mit anderen Proteinen fusioniert werden kann, ohne dass die Fluoreszenz verloren geht (Chalfie, 1995). Da zur Fluoreszenz keinerlei Co-Faktoren benötigt werden, konnte GFP inzwischen in einer Vielzahl von Organismen erfolgreich funktional exprimiert werden. Trotz der vielen Vorteile des GFPs zeigten sich bald Grenzen in der Anwendung. So bildet sich das Chromophor relativ langsam (bis zu zwei Stunden nach der Synthese), bei Temperaturen über 20°C neigt GFP zur Bildung inaktiver Aggregate und es weist eine geringe Fluoreszenz-Intensität auf. Um die Eigenschaften des GFPs zu verbessern, wurde eine Vielzahl von Varianten durch Mutagenese erstellt. Dabei wurden nicht nur Variationen der direkt an der Chromophor-Bildung beteiligten Aminosäuren (65-67), sondern auch der in räumlicher Nähe befindlichen Aminosäuren erzeugt (siehe Abbildung 6 und Tabelle 1).

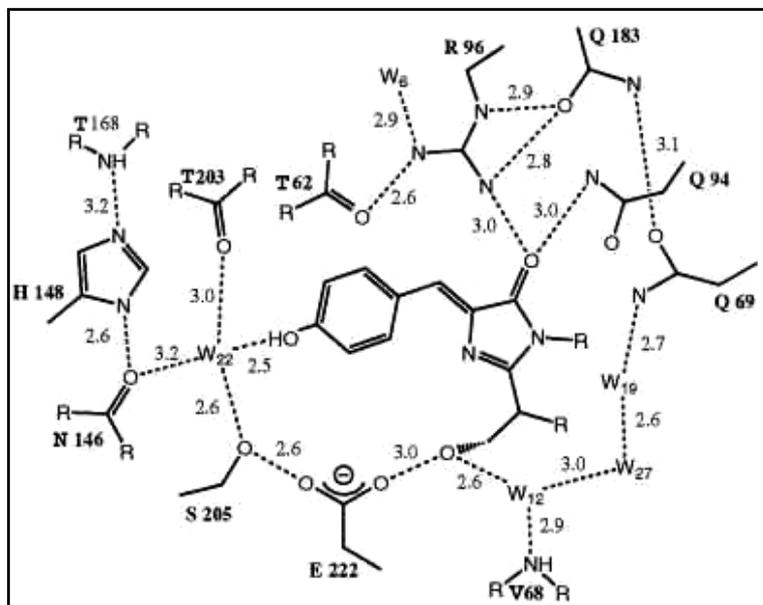


Abbildung 6: Wechselwirkungen zwischen Chromophor und direkter Umgebung

Beteiligte Seitenketten sind mit Aminosäurecode und der Position in der Sequenz gekennzeichnet. Nummerierte Ws bezeichnen Wassermoleküle, die an den Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt) beteiligt sind. Die Bindungslängen sind in Angström angegeben (nach (Brejc *et al.*, 1997))

Mutation ^a	Common name	λ_{exc} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^c	Rel. fl. ^d @ 37°C	References ^e
Class 1, wild-type					
None or Q80R	Wild type	395–397 (25–30) 470–475 (9.5–14)	504 (0.79)	6	43, 45
F99S, M153T, V163A	Cycle 3	397 (30) 475 (6.5–8.5)	506 (0.79)	100	43, 45
Class 2, phenolate anion					
S65T		489 (52–58)	509–511 (0.64)	12	43–45
F64L, S65T	EGFP	488 (55–57)	507–509 (0.60)	20	43–45
F64L, S65T, V163A		488 (42)	511 (0.58)	54	44
S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	Emerald	487 (57.5)	509 (0.68)	100	44
Class 3, neutral phenol					
S202F, T203I	H9	399 (20)	511 (0.60)	13	44
T203I, S72A, Y145F	H9–40	399 (29)	511 (0.64)	100	44
Class 4, phenolate anion with stacked π -electron system (yellow fluorescent proteins)					
S65G, S72A, T203F		512 (65.5)	522 (0.70)	6	44
S65G, S72A, T203H		508 (48.5)	518 (0.78)	12	44
S65G, V68L, Q69K S72A, T203Y	10C Q69K	516 (62)	529 (0.71)	50	44
S65G, V68L, S72A, T203Y	10C	514 (83.4)	527 (0.61)	58	44
S65G, S72A, K79R, T203Y	Topaz	514 (94.5)	527 (0.60)	100	44
Class 5, indole in chromophore (cyan fluorescent proteins)					
Y66W		436	485	—	21
Y66W, N146I, M153T, V163A	W7	434 (23.9) 452	476 (0.42) 505	61	44
F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	W1B or ECFP	434 (32.5) 452	476 (0.4) 505	80	44
S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	W1C	435 (21.2)	495 (0.39)	100	44
Class 6, imidazole in chromophore (blue fluorescent proteins)					
Y66H	BFP	384 (21)	448 (0.24)	18	44
Y66H, Y145F	P4–3	382 (22.3)	446 (0.3)	52	44
F64L, Y66H, Y145F	EBFP	380–383 (26.3–31)	440–447 (0.17–0.26)	100	43, 44
Class 7, phenyl in chromophore					
Y66F		360	442	—	22

Tabelle 1: Spektrale Eigenschaften der sieben Hauptklassen der GFPs (Beschriftung siehe nächste Seite)

^a Angabe der Mutationsstelle und des Aminosäureaustauschs. Der erste Buchstabe bezeichnet die wildtypische Aminosäure, die ersetzt wurde.

^b Anregungsmaximum in nm. In Klammern ist der Extinktionskoeffizient in $10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ angegeben. Durch Bindestrich getrennte Werte geben den Bereich an, in dem von verschiedenen Autoren bestimmte Werte liegen.

^c Emissionsmaximum in nm. In Klammern angegeben ist die Fluoreszenz Quantenausbeute (dimensionslos). Ein allgemeines Maß für die Helligkeit einer Mutante ergibt sich aus dem Produkt aus Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute.

^d Relative Fluoreszenzintensität von in *E.coli* bei 37°C exprimiertem Protein unter Berücksichtigung der Quantenausbeute, des Extinktionskoeffizienten und der Faltungseffizienz bei 37°C. Die Werte stellen nur eine Annäherung dar und können nur innerhalb einer Klasse miteinander verglichen werden. Dabei wurde der höchste Wert einer Klasse auf 100 normiert. (aus (Tsien, 1998)).

In diesen Experimenten wurden nicht nur heller leuchtende Varianten des wildtypischen GFPs erhalten, sondern auch Proteine mit veränderten spektralen und physikalischen Eigenschaften. Man erhielt Varianten, die auch bei Temperaturen $> 20^\circ\text{C}$ eine

hohe Faltungseffizienz aufweisen. Durch die Mutation F64L erhöhte sich die Löslichkeit. Bei vielen Varianten wurde auch die Codon-Usage auf den Zielorganismus angepasst, so dass eine effektivere Expression möglich wurde. Durch Mutation der an der Chromophor-Bildung beteiligten Aminosäuren (65-67) oder aber in seiner direkten räumlichen Umgebung (siehe Abbildung 6) wurden Spektralvarianten wie z.B. *blue*, *cyan* und *yellow fluorescent protein* (BFP, CFP, YFP) erhalten. Alle bisher bekannten GFP-Varianten können in sieben Klassen eingeteilt werden (Tabelle 1):

Die GFPs der Klasse I bilden genau wie das wildtypische Protein eine Mischung aus neutralem Phenol und Phenolat-Anion. Daher besitzen alle Proteine dieser Klasse zwei Absorptionsmaxima.

Bei der II. Gruppe liegt das Chromophor ausschließlich als Anion vor, wodurch diese Varianten nur ein Absorptionsmaximum aufweisen. Im Vergleich zum Wildtyp findet man zudem eine Rotverschiebung .

Im Gegensatz zur II. Klasse wird die Ionisierung des Chromophors bei den Varianten der Klasse III unterdrückt. So wird durch den Austausch T203I eine OH-Gruppe aus der direkten Umgebung des Chromophors entfernt und daher das Phenolat-Anion nicht mehr ausreichend stabilisiert. Im Grundzustand liegt daher ausschließlich die Phenolform vor, die nach Anregung bei etwa 395 nm auf Grund des höheren Säurecharakters (s.o.) dennoch deprotoniert wird und daher Licht bei etwa 510 nm emittiert.

Wird Thr²⁰³ durch eine aromatische Aminosäure (His, Trp, Phe, Tyr) ersetzt, kommt es durch die Wechselwirkung der π -Elektronensysteme von Chromophor und der Aminosäure 203 zu einer Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge zu höheren Werten. Aufgrund dieser Gelbverschiebung werden die Proteine der Klasse IV auch als gelb fluoreszierende Proteine bezeichnet (YFP; *yellow fluorescent proteins*).

Bei GFP-Varianten der Klasse V wurde Tyr⁶⁶ durch Trp ersetzt, wodurch ein Indol anstelle des Phenols oder Phenolat-Anions im Chromophor vorliegt. Dies führt zur Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums zu kleineren Werten. Daher werden diese Proteine als *cyan fluorescent proteins* (CFP) bezeichnet. Um trotz des größeren Indols eine effiziente Faltung des Proteins und damit eine ausreichende Quantenausbeute zu gewährleisten sind weitere Mutationen nötig.

Wird Tyr⁶⁶ durch His ersetzt, verschiebt sich durch das Imidazol (Klasse VI) das Absorptions- und Emissionsmaximum noch weiter in den blauen Bereich. Die resultierenden *blue fluorescent proteins* (BFP) zeigen eine geringe Quantenausbeute und bleichen schnell aus.

Der Austausch des Tyr⁶⁶ gegen Phe führt ebenfalls zu einer Blauverschiebung. Diese Variante (Klasse VII) wird jedoch kaum eingesetzt.

Die Entwicklung von Proteinen mit veränderten spektralen Eigenschaften erhöhte den Anwendungsbereich enorm. Mit den neuen Mutanten konnten nicht nur mehrere Proteine pro Zelle untersucht werden, sondern es konnten auch Interaktionen über Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) nachgewiesen werden. Aber nicht nur Protein-Protein Interaktionen können so bestimmt werden, sondern auch Calcium-Ionen-Konzentrationen *in vivo* visualisiert werden.

1.2. Das rot fluoreszierende Protein drFP583 aus Korallen der Gattung *Discosoma*

Neben der Einführung von Mutationen wurden jedoch auch GFP-homologe Proteine in anderen Organismen gesucht. Den Durchbruch brachte die Identifizierung von sechs zu GFP homologen Proteinen in Korallen (Matz *et al.*, 1999). Zwei der gefundenen Proteine wiesen größere Unterschiede in den spektralen Eigenschaften zu GFP auf. Vor allem eine in den roten Spektralbereich verschobene Variante (drFP583, dsRed) erfreut sich großer Beliebtheit.

Das Besondere an dsRed ist die zeitlich versetzte Emission bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Neu gebildetes dsRed emittiert grünes Licht bei ca. 500nm mit schwacher Intensität. Nach einiger Zeit verschiebt sich die Emission in den Rotbereich und das Protein emittiert nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von ca. 580nm (siehe Abbildung 8 links) (Matz *et al.*, 1999). Der Grund hierfür liegt in der autokatalytischen Bildung des Chromophors, die schließlich in dem rot emittierenden Chromophor endet, jedoch über eine grün emittierende Zwischenstufe abläuft (siehe Abbildung 7). Diese Zwischenstufe weist ein mit GFP vergleichbares System von konjugierten Doppelbindungen auf, so dass sowohl Anregungswellenlänge als auch Emissionswellenlänge ähnlich sind. In einem weiteren Schritt wird das dsRed-Chromophor erneut oxidiert, so dass die Anzahl an konjugierten Doppelbindungen erhöht wird. Diese Erhöhung ist verantwortlich für die Rot-Verschiebung des Anregungs- und Emissionsmaximums.

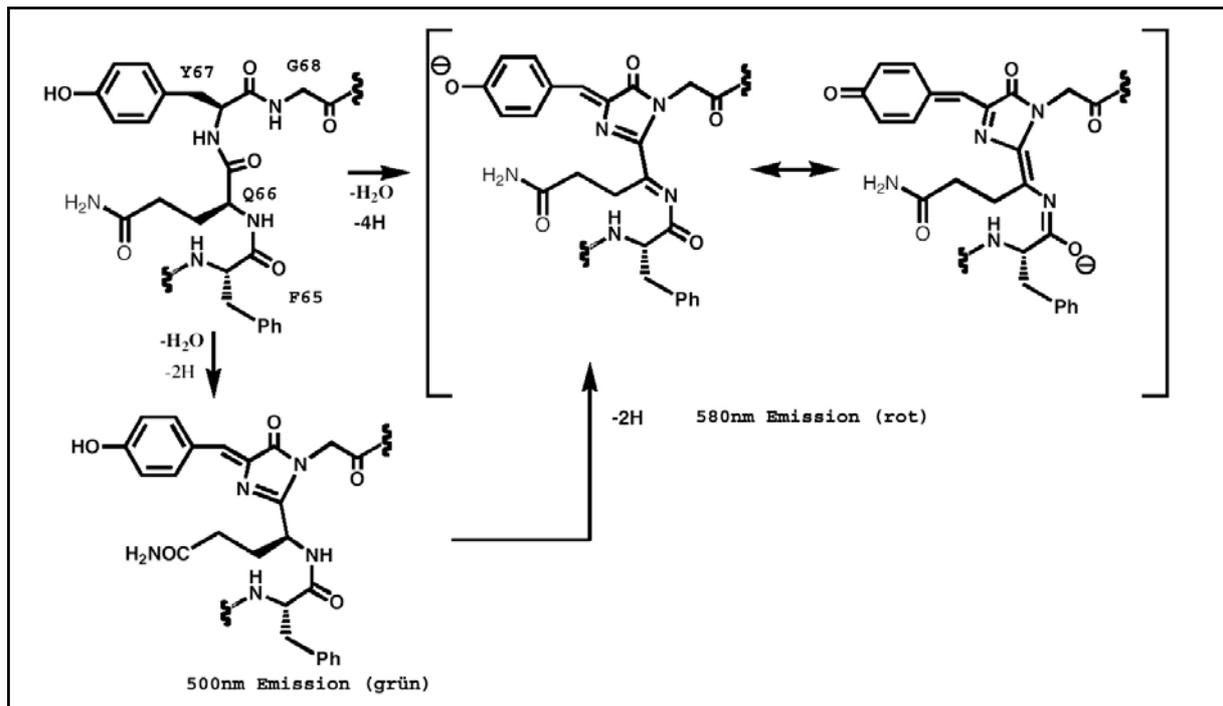


Abbildung 7: Autokatalytische Synthese des Chromophors von dsRed (aus (Gross *et al.*, 2000), modifiziert)

Die direkt an der Synthese beteiligten Aminosäuren sind mit Position und Ein-Buchstaben-Kürzel angegeben. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, die Emissionsmaxima des Zwischenproduktes und des Endproduktes sind angegeben.

Den mit einer messbaren Wellenlängenverschiebung einhergehenden „Reifungsprozess“ des dsRed kann man sich für Studien zu nutze machen, um z.B. Promotoraktivität zeitlich einzugrenzen. Allerdings ist das wildtypische Protein auf Grund der geringen Quantenausbeute des grünen Emissionsmaximums dafür wenig geeignet. Den Durchbruch brachte das Timer-Protein, das durch zwei Aminosäureaustausche (V105A und S197T) hergestellt werden konnte (Terskikh *et al.*, 2000) und eine deutlich höhere Fluoreszenzausbeute im grünen Bereich liefert (siehe Abbildung 8).

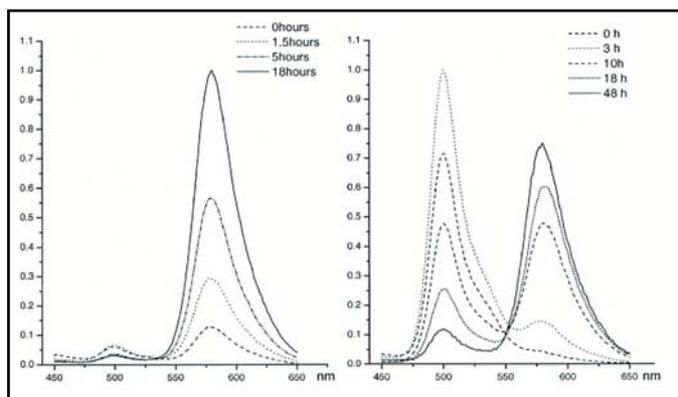


Abbildung 8: Emissionsspektren von wt-dsRed (links) und dem Timer-Protein; aus (Terskikh *et al.*, 2000)

Gezeigt sind die Emissionsspektren unterschiedlicher Zeitpunkte des Reifungsprozesses.

1.3. *Literatur:*

- Brejc, K., et al.**; "Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein"; *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997); **94** (6); 2306-11
- Chalfie, M.**; "Green fluorescent protein"; *Photochem Photobiol* (1995); **62** (4); 651-6
- Chalfie, M., et al.**; "Green fluorescent protein as a marker for gene expression"; *Science* (1994); **263** (5148); 802-5
- Cubitt, A. B., et al.**; "Understanding, improving and using green fluorescent proteins"; *Trends Biochem Sci* (1995); **20** (11); 448-55
- Gross, L. A., et al.**; "The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral"; *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000); **97** (22); 11990-5
- Heim, R., et al.**; "Improved green fluorescence"; *Nature* (1995); **373** (6516); 663-4
- Heim, R., et al.**; "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein"; *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994); **91** (26); 12501-4
- Matz, M. V., et al.**; "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species"; *Nat Biotechnol* (1999); **17** (10); 969-73
- Morise, H., et al.**; "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*"; *Biochemistry* (1974); **13** (12); 2656-62
- Ormo, M., et al.**; "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein"; *Science* (1996); **273** (5280); 1392-5
- Prasher, D. C., et al.**; "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein"; *Gene* (1992); **111** (2); 229-33
- Reid, B. G., et al.**; "Chromophore formation in green fluorescent protein"; *Biochemistry* (1997); **36** (22); 6786-91
- Shimomura, O., et al.**; "Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*"; *J. Cell. Comp. Physiol.* (1962); **59**; 223-240
- Terskikh, A., et al.**; "'Fluorescent timer': protein that changes color with time"; *Science* (2000); **290** (5496); 1585-8
- Tsien, R. Y.**; "The green fluorescent protein"; *Annu Rev Biochem* (1998); **67**; 509-44
- Yang, F., et al.**; "The molecular structure of green fluorescent protein"; *Nat Biotechnol* (1996); **14** (10); 1246-51
- Youvan, D. C., et al.**; "Structure and fluorescence mechanism of GFP"; *Nat Biotechnol* (1996); **14** (10); 1219-20